

Rec'd PCT/PTO 07 OCT 2004



EPO-BERLIN

23 -05- 2003

REC'D 27 JUN 2003

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 21 957.5

Anmeldetag: 09. April 2002

Anmelder/Inhaber: Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin/DE

Bezeichnung: Automatischer Probensammler

IPC: G 01 N 1/10

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 7. April 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Ebert

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung der Erfindung

Für das Sammeln flüssiger Volumenfraktionen des Eluates von Chromatographiesäulen oder des Abflusses eines Reaktionsgefäßes, z.B. eines Bioreaktors, können handelsübliche Fraktionssammler eingesetzt werden, bei denen die Volumendosierung durch einen Siphon, einen Tropfenzähler oder die Flusszeit bei konstanter Fließgeschwindigkeit erfolgt. Diese für den Laborbetrieb entwickelten Geräte enthalten Elektromotore, mit deren Hilfe die Probensammelgefäße und der Zufluss beim Gefäßwechsel zueinander positioniert werden. Handelsübliche Fraktionssammler verhindern nicht den Kontakt der Atmosphärenluft und der in ihr vorhandenen Mikroorganismen mit der zu sammelnden und zu portionierenden Flüssigkeit. Sie können nicht ohne zusätzliche Schutzmaßnahmen eingesetzt werden, wenn in den gesammelten Volumenfraktionen flüchtige oder oxidationsempfindliche Stoffe analysiert werden sollen. Handelsübliche Fraktionssammler müssen für den Batteriebetrieb umgebaut werden, wenn sie im Freiland eingesetzt werden sollen. Ihre Anwendung unter Wasser ist nicht möglich.

Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines automatischen Probensammlers, der unter Wasser eingesetzt werden kann und bei dem die Aufteilung des Flüssigkeitsstromes in die einzelnen Volumenfraktionen automatisch ohne den Anschluss an eine Stromquelle erfolgt. Die zu sammelnde Flüssigkeit soll von der äußeren Gasatmosphäre abgeschlossen werden können. Der Probensammler soll miniaturisierbar sein und das Sammeln von sehr kleinen, wenige μl umfassenden Proben ermöglichen. Ausserdem soll der Fraktionssammler bei Bedarf, in Verbindung mit einer Kühlvorrichtung, das Einfrieren der gesammelten Proben ermöglichen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch einen automatischen Probensammler gelöst, der folgende Merkmale besitzt (vergl. Figur 1): ein oder mehrere an einer Förderleitung (a) in Reihe angeordnete Probensammelgefäße (b) haben Zugang zur Förderleitung, und nach jeder Verbindung mit einem Probensammelgefäß enthält die Förderleitung eine gasdurchlässige Flüssigkeitsbarriere (c), die im trockenen Zustand gasdurchlässig ist und für Flüssigkeiten mit Überdruck überwunden werden kann.

Die erfindungsgemäße Anordnung bewirkt, dass sich das Probensammelgefäß füllt, wonach der Druck der Flüssigkeit in der Förderleitung ansteigt und die Flüssigkeitsbarriere überwindet, so dass die Füllung des nächsten Probensammelgefäßes möglich wird. Mit dem erfindungsgemäßen Probensammler können gleich große Volumina einer wässrigen Lösung durch Füllung gleichartiger Probensammelgefäße nacheinander gesammelt werden, auch wenn

die Fließgeschwindigkeit nicht konstant ist. Sämtliche Teile des erfindungsgemäßen Probensammlers können aus einem oder mehreren autoklavierbaren und chemisch resistenten Stoffen, z.B. Polypropylen oder Teflon bestehen. Der erfindungsgemäße Probensammler eignet sich für die Produktion und den Einsatz als Einwegprodukt. In einem Probensammler können erfindungsgemäß alle Hohlräume und Kanäle, einschließlich der Probessammelgefäße, in einen Feststoff eingearbeitet, z.B. eingepresst oder eingätzt werden. Der erfindungsgemäße Probensammler kann aus einem einzigen Feststoffkörper oder aus einer Förderleitung mit eingearbeiteten Benetzungsbarrieren und von diesem abtrennbaren Probessammelgefäßen bestehen.

Das Probessammelgefäß kann mit der Förderleitung durch einen einzigen Zugang verbunden sein. In diesem Fall bestehen verschiedene Möglichkeiten für die Ableitung der im Probessammelgefäß enthaltenen Luft. Zur Ableitung der Luft ist es vorteilhaft, wenn das Probessammelgefäß eine weitere gasdurchlässige Flüssigkeitsbarriere (d) enthält, deren Überwindung einen höheren Druck erfordert als die Überwindung der Flüssigkeitsbarriere c. Das Probessammelgefäß kann sich ohne Druckanstieg füllen. Der Druckanstieg in der Förderleitung nach der Füllung führt zur Überwindung der Flüssigkeitsbarriere c und ermöglicht den Transport der Flüssigkeit zum nächsten Probessammelgefäß.

Die Flüssigkeitsbarriere d kann als ein feinporiges bakteriendichtes Filter aus Polypropylen oder einem ähnlichen wasserabweisenden Stoff gestaltet sein und die Entnahme der Probe mit einer Kanüle ermöglichen. Die Probessammelgefäße können an der Förderleitung durch eine Steckverbindung angeschlossen sein, so dass die Proben durch Lösen der Steckverbindung entnommen werden können.

Das Probessammelgefäß kann mit der Förderleitung auch durch eine Zuleitung (e) und eine Ableitung (f) verbunden sein. In diesem Fall ist es vorteilhaft, die gasdurchlässige Flüssigkeitsbarriere c zwischen der Zuleitung und der Ableitung anzubringen und die zur Entlassung des Gases aus dem Probessammelgefäß beim Einströmen der Flüssigkeit eingesetzte gasdurchlässige Flüssigkeitsbarriere d in der Ableitung f unterzubringen.

Wenn das Probessammelgefäß durch eine Zuleitung und eine Ableitung mit der Förderleitung verbunden ist und das Probessammelgefäß unter den Gefrierpunkt gekühlt wird, kann die in das Probessammelgefäß eintropfende Flüssigkeit gefrieren. Die Ableitung kann durch das gebildete Eis verschlossen werden, so dass keine Flüssigkeitsbarriere in der Gefäßableitung oder im Gefäß vorgeschoben werden muss.

Der Zutritt von Sauerstoff zu den Proben kann dadurch verhindert werden, dass die Förderleitung mit Stickstoff oder Argon gefüllt wird und der Druckausgleich mit der

Atmosphäre am Ende der Förderleitung über einen Kolben, der in einem Zylinder gleitet, durchgeführt wird. Wird der erfindungsgemäße Probensammler zur Ablage von Fraktionen aus einem kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom mit konstanter Fließgeschwindigkeit genutzt, wie es bei der präparativen Chromatographie oder am Ausgang einer analytischen Dialyseapparatur üblich ist, sind für seine Funktion keine beweglichen festen Teile erforderlich. Es ist jedoch möglich, den erfindungsgemäßen Probensammler mit einer Fördervorrichtung für die Flüssigkeit (g) und/oder mit Ventilen (h) zu versehen, die es gestatten, aus einem Reservoir oder einem Reaktionsbehälter flüssige Proben mit vorgegebenem Volumen zu festgelegten Zeiten in die Probensammelgefäße zu überführen. Die Förderleitung kann an ein evakuiertes Gefäß oder an eine Unterdruckquelle angeschlossen werden, um einen Sog für den Einstrom der Flüssigkeit zu erzeugen. Das Zeitregime für diesen Strom kann bei Bedarf durch Ventile entsprechend einem vorgegebenen Programm gesteuert werden. Um den Flüssigkeitsstrom nach Füllung eines Gefäßes zu unterbrechen, kann ein Drucksensor (i) als Signalgeber für die Steuerung der Flüssigkeitsförderung eingesetzt werden. Beim Durchströmen der Benetzungsbarriere c kommt es zu einem Druckabfall im Drucksensor i, der vor dem ersten Probensammelgefäß positioniert ist und die Druckdifferenz der Flüssigkeit in der Förderleitung zur Atmosphäre mißt. Die beim Durchbrechen der Flüssigkeitsbarriere c erfolgende Druckänderung oder die Druckänderung an einer starken Flüssigkeitsbarriere, die sich am Ende der Förderleitung befindet, können zur Steuerung der Fördereinrichtung genutzt werden. Diese Steuerung kann so eingerichtet werden, dass der Strom nach Füllung eines oder mehrerer Gefäße oder nach Füllung aller Gefäße unterbrochen wird.

Anwendungsbeispiele

1. Der erfindungsgemäße Probensammler wird an eine präparative Säule für die Niederdruck-Chromatographie angeschlossen. Der Fluss durch die Säule wird durch eine Pumpe oder die Höhendifferenz zwischen dem Vorratsgefäß und den Probensammelgefäßen erzeugt. Auch wenn die Konstanz der Fließgeschwindigkeit nicht gewährleistet wird, kann jedem Probensammelgefäß ein bestimmter Anteil am Packungsvolumen der Säule zugeordnet werden.
2. Der erfindungsgemäße Probensammler wird an eine präparative HPLC-Anlage angeschlossen, um das Eluat unter Stickstoffatmosphäre zu fraktionieren. Vor dem Auflagen der Probe und dem Anschluss des Probensammlers werden Säule und Detektor der HPLC-Anlage mit einem Puffer durchspült, der mit reinem Stickstoff gesättigt ist. Der eingesetzte erfindungsgemäße Probensammler ist vor dem Einsatz an beiden Enden verschlossen und mit reinem Stickstoff gefüllt. Die Förderleitung endet in einen Zylinder mit dicht gleitendem Kolben. Wenn die HPLC -Anlage mit konstanter Flußrate betrieben wird, können die nacheinander gefüllten Probensammelgefäße den am Detektor aufgezeichneten Peaks zugeordnet werden. In ähnlicher Weise kann der erfindungsgemäße Probensammler in Verbindung mit einer Pumpe mit konstanter Förderleistung eingesetzt werden, um Volumenfraktionen aus einem Reaktionsgefäß, einem Fermentor, aus dem Blutkreislauf eines Tieres oder des Menschen u.s.w. zu entnehmen und einer bestimmten Entnahmezeit zuzuordnen. Zur Fixierung der Probebestandteile bzw. zur Unterbindung des Mikробenwachstums können die Probensammelgefäße geeignete Stoffe enthalten.
3. Der erfindungsgemäße Probensammler wird genutzt, um aus dem Interstitialwasser im Wurzelbereich von im Wasser stehenden Schilfpflanzen im Laufe einer längeren Untersuchung zu frei wählbaren Zeiten oder nach einem festeingestellten Zeitregime Proben mit definiertem Volumen zu entnehmen und nacheinander abzulegen. Zu diesem Zweck wird in den Wurzelbereich eine Mikrofiltrations-Sonde eingeführt und über einen Polypropylenschlauch an den erfindungsgemäßen Probensammler angeschlossen. In der Förderleitung des Probensammlers sind vor dem ersten Probensammelgefäß ein Ventil, ein flußbegrenzender Widerstand in Form einer Kapillare, und ein Drucksensor angeordnet. Hinter dem letzten Probensammelgefäß ist die Förderleitung an ein Unterdruckgefäß angeschlossen, in welchem der Druck gegenüber Atmosphärendruck um ca. 20 kPa abgesenkt

wurde. Alle Teile des Probensammlers liegen unter Wasser. Der flussbegrenzende Widerstand bewirkt, dass die im Unterdruckgefäß angelegte Druckdifferenz zum Atmosphärendruck nahezu ungemindert am Drucksensor anliegt, bis die Flüssigkeit das Probesammelgefäß gefüllt hat. Sobald die Benetzungsbarriere d den Fluss unterbricht, steigt der Druck am Drucksensor an, bis die Benetzungsbarriere c überwunden ist und durchströmt wird. Dies führt dazu, dass der Druck am Drucksensor wieder absinkt. Die Steuerung des Ventils ist so eingerichtet, dass es geschlossen wird, wenn der Druck am Drucksensor zweimal nacheinander absinkt. Zu jedem gewählten Meßzeitraum werden daher zwei Gefäße gefüllt, anschließend ist die Probenahme unterbrochen. Für die Analyse wird das zweite der bei der Probenahme gefüllten Gefäße eingesetzt, um die Vermischung mit der zwischen den Probezeiten in der Förderleitung stehenden Flüssigkeit zu vermeiden. Das Ventil öffnet nach Steuerung von Hand oder Signalgebung durch einen voreingestellten Zeitgeber, um die nächsten beiden Probesammelgefäße zu füllen.

4. Der erfindungsgemäße Probensammler wird genutzt, um bakterienfreie Proben aus einem Fermentor in regelmäßigen Abständen für die Analytik zu entnehmen und nacheinander abzulegen. Hierzu wird der erfindungsgemäße Probensammler vor dem Autoklavieren des Fermentors an einen im Fermentor integrierten Port mit einem Mikrofilter aus autoklavierbarem Polypropylen oder Teflon angeschlossen. Der Probensammler besteht aus autoklavierbarem Polypropylen. Die gasgefüllte Förderleitung führt nach dem letzten Probesammelgefäß in ein wassergefülltes Gefäß mit wassergefülltem Ableitungsschlauch, der für den Anschluss einer Peristaltikpumpe vorgesehen ist. Der Fermentor und der angeschlossene Probensammler werden gemeinsam autoklaviert. Während des Fermentorbetriebes werden mit Hilfe der Peristaltikpumpe nach einem vorgegebenen Zeitprogramm Proben gesammelt. Dabei wird der Fluss unterbrochen, wenn zwei Probegefäße gefüllt sind, wie in Beispiel 3 erläutert.

5. Der erfindungsgemäße Probensammler wird mit der Ableitung eines Dialysegerätes verbunden, um in zeitlich geordneter Weise Dialysatproben vom Grund eines Gewässers zu entnehmen. In der Zuleitung zum Dialysegerät befindet sich eine mit Batterie oder Federkraft betriebene Kolbenpumpe, welche aus einem Vorratsgefäß reines Wasser mit konstanter Flußrate in das Dialysegerät einströmen läßt. Die Geschwindigkeit des Durchflusses durch das Dialysegerät liegt unter der kritischen Geschwindigkeit für die Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes für die Analyten und wird so gewählt, dass die Probegefäße des

Fraktionssammlers im gewählten Untersuchungszeitraum gefüllt werden. Hierdurch kann der Füllung jedes Probesammelgefäßes mit dem Dialysat ein bestimmter Zeitabschnitt zugeordnet werden.

6. Der erfindungsgemäße Probensammler besteht aus einem Feststoffkörper aus Silizium, Polypropylen oder Silikon mit eingearbeiteten Kanälen und Räumen, welche entsprechend der Abbildung die Förderleitung, Zu- und Ableitung sowie die Probesammelgefäße repräsentieren. Er wird durch eine dichte Verbindung zwischen einer Grundplatte, in welche die Förderleitung und die angeschlossenen Probesammelgefäße eingearbeitet wurden, und einer Deckplatte, z.B. durch Bonden oder Pressen hergestellt. Die Deckplatte enthält in der Position der Probesammelgefäße bzw. Probesammelräume eine feine Pore oder ein Diaphragma zur Entnahme der Probe mit einer Kapillare oder Kanüle. Das Volumen der Probesammelgefäße beträgt einige μl , das Volumen der übrigen Kanäle, d.h. der Förderleitung, der Zu- und Ableitung, Bruchteile eines μl . Der Probensammler wird eingesetzt, um die elektro-osmotisch aus einer Kapillarelektrophoresisapparatur ausgetretenen Proben getrennt zu sammeln.

7. Der erfindungsgemäße Probensammler besitzt eine Kühlvorrichtung, die es ermöglicht, dass die Probegefäße bei einer Temperatur deutlich unter dem Gefrierpunkt des Wassers gehalten werden. Die thermisch isolierte Förderleitung hat eine Temperatur über dem Gefrierpunkt des Wassers. Die Probesammelgefäße sind aufrecht im Schwerfeld positioniert und die Förderleitung liegt über den Probesammelgefäßen, die mit ihr durch eine Zuleitung und Ableitung verbunden sind. Dieser Probensammler wird genutzt, um Proben aus einem Reaktionsgefäß oder einem Bioreaktor zu sammeln und sofort nach dem Eintropfen in die Probesammelgefäße einzufrieren. Sobald das gebildete Eis die Ableitung des Probesammelgefäßes verstopft, steigt der Druck der Flüssigkeit in der Förderleitung an, die Flüssigkeitsbarriere wird überwunden und die Füllung des nächsten Probesammelgefäßes ermöglicht.

8. Der erfindungsgemäße Probensammler ist mit einer Mikro-Schlauchpumpe verbunden, die auf der Förderleitung vor dem ersten Probesammelgefäß liegt. Die Probesammelgefäße sind als blind endende Kanäle mit einem annähernd isodiametrischem 4 mm starken Querschnitt und einer Länge von 2 cm gestaltet, die über einen 1 mm weiten Kanal mit der Förderleitung verbunden sind. An dem von der Förderleitung entfernten Ende des Probesammelgefäßes

befindet sich eine gasdurchlässige Flüssigkeitsbarriere d in Form einer Polypropylenmembran mit 100 µm Porenweite. Nach jedem der Probesammelgefäße enthält die Förderleitung als Flüssigkeitsbarriere c eine Polypropylenkapillare. Die Förderleitung endet nach dem letzten Probesammelgefäß mit einer feinporigen Polypropylenmembran. Vor dem ersten Probesammelgefäß ist in der Förderleitung ein Drucksensor angebracht. Der Drucksensor ist mit der Steuerung der Pumpe verbunden, welche bewirkt, dass der Pumpvorgang beendet wird, wenn die Flüssigkeit das Ende der Förderleitung erreicht und der Druck in der Förderleitung auf Grund der terminalen starken Flüssigkeitsbarriere über einen Schwellenwert ansteigt. Der Probesammler mit der batteriegetriebenen Pumpe kann bequem am menschlichen oder tierischen Körper befestigt und ohne Behinderung getragen werden. Alle durchströmten Teile sind keimfrei und vor der Verwendung entsprechend verpackt. Sie können an einen Blutentnahmekatheter angeschlossen und zur Analyse der Dynamik eines Arzneistoffes verwendet werden, wobei das Zeitfenster für die Untersuchung durch die Pumpgeschwindigkeit festgelegt wird.

Automatischer Probensammler

Erfindungsansprüche

1. Automatischer Probensammler für Flüssigkeiten mit folgenden Merkmalen: ein oder mehrere an einer Förderleitung (a) in Reihe angeordnete Probesammelgefäße (b) haben Zugang zu einer Förderleitung, und nach jedem Zugang zu einem Probesammelgefäß enthält die Förderleitung a eine gasdurchlässige Flüssigkeitsbarriere (c), die im trockenen Zustand gasdurchlässig ist und für Flüssigkeiten mit Überdruck überwunden werden kann.
2. Automatischer Probensammler nach Anspruch 1, wobei jedes Probesammelgefäß eine weitere gasdurchlässige Flüssigkeitsbarriere (d) enthält und die Überwindung der Flüssigkeitsbarriere d einen höheren Überdruck erfordert als die Überwindung der Flüssigkeitsbarriere c.
3. Automatischer Probensammler nach Anspruch 1, bei dem jedes Probesammelgefäß durch eine gesonderte Zuleitung (e) und eine gesonderte Ableitung (f) mit der Förderleitung verbunden ist und die Flüssigkeitsbarriere c sich in der Förderleitung zwischen der Zuleitung und der Ableitung des Probesammelgefäßes befindet.
4. Automatischer Probensammler nach Anspruch 2 und 3, wobei die Flüssigkeitsbarriere d sich in der Ableitung f befindet.
5. Automatischer Probensammler nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem die Förderleitung eine Fördervorrichtung (g) und/oder ein Ventil (h) und einen Drucksensor (i) enthält und außerdem eine Steuerung eingerichtet ist, durch welche nach einer voreingestellten Veränderung des Druckes in der Förderleitung der Flüssigkeitsstrom unterbrochen wird.
6. Automatischer Probensammler nach einem der Ansprüche 1-5, bei dem die Förderleitung oder die Probesammelgefäße bzw. die Förderleitung mit den Probesammelgefäßen in einen Feststoffkörper eingearbeitet sind.
7. Automatischer Probensammler nach einem der Ansprüche 1-5, bei dem die Förderleitung und die Probesammelgefäße voneinander getrennt werden können.

Ober Fernkopierer eingegangen. 1

Seite(n) - Deutsches Patent-
und Markenamt

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen automatischen Probensammler für Flüssigkeiten, die z.B. aus einer Chromatographiesäule, einer Dialyseapparatur oder einem Reaktionsgefäß austreten und nacheinander mit einer definierten Volumenteilung gesammelt werden. Dabei erfolgt die Volumenteilung erfindungsgemäß durch Zuordnung einer oder mehrerer gasdurchlässiger Flüssigkeitsbarrieren zu jedem Probensammelgefäß. Der Probensammler kann als Einwegartikel aus Polypropylen, Teflon oder anderen geeigneten Materialien hergestellt werden. Vorteile der Erfindung sind u.a. die Entbehrlichkeit einer Energiequelle, die Autoklavierbarkeit und die Miniaturisierbarkeit der Apparatur. Der Bau des erfindungsgemäßen Probensammlers ermöglicht es, den Inhalt der Probensammelgefäße frei von Sauerstoff zu halten oder die in die Probensammelgefäße einströmende Flüssigkeit sofort einzufrieren.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.